

ESTABELEECIMENTO DE CULTURA PRIMÁRIA DE TUMOR DESMÓIDE COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA COM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE DERME NORMAL*

*Establishment of primary cell culture of desmoid tumor
Histologic comparison with primary culture of normal dermal cell*

DÉBORA CASTANHEIRA PEREIRA DA SILVA¹ SHIGUEKO SONOHARA² MONICA SCHWARZSCHILD² MARIA MITZI BRENTANI² RUY GERALDO BEVILACQUA³

Apesar de sua primeira descrição ter sido em 1832, os tumores desmóides constituem até hoje uma incógnita. Sua etiologia continua desconhecida. Ainda não se tem sequer a certeza se são apenas formações fibroblásticas benignas ou se constituem verdadeiras neoplasias. Estabelecemos cultura primária destes tumores e fizemos uma comparação histológica com cultura de células de derme normal do mesmo paciente. Constatamos que existem diferenças histológicas significativas entre os fibroblastos de tumor desmóide (miofibroblastos) e os de pele normal que sugerem um comportamento celular tumoral dos desmóide em cultura.

Unitermos: Tumor desmóide. Cultura primária histológica.
Keywords: Desmoid tumor. Histologic primary culture.

* Trabalho realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- 1 - Titular do Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A. C. Camargo.
- 2 - Pesquisadores do Laboratório de Oncologia Experimental da FMUSP.
- 3 - Diretor do Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A. C. Camargo.

Endereço para correspondência: Dra. Débora Castanheira P. da Silva - Hospital A. C. Camargo - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - 01509-010 - São Paulo - SP

Introdução

O tumor desmóide foi descrito pela primeira vez por John Mac Farlane em 1832 (4), no compêndio de casos de sua enfermaria. O termo "desmóide" foi criado por Müller (5) em 1838 e é derivado da palavra grega "desmos" que significa tendão. A sinonímia inclui vários outros nomes como fibromatose músculo-aponevrótica, fibromatose profunda e fibromatose agressiva (2).

São tumores que se originam de estruturas músculo-aponevróticas de qualquer local do corpo, apresentam um crescimento lento e progressivo comprometendo tecidos adjacentes, podendo invadir estruturas ósseas, nervosas e vasculares (2). Não dão metástases à distância.

As fibromatoses têm chamado a atenção dos patologistas e cirurgiões desde que foram descritas como um grupo de proliferações fibroblásticas que precisam ser distinguidas dos fibrossarcomas.

São tumores encontrados tanto na infância quanto em adultos e apresentam um comportamento clínico semelhante com

tendência à recorrência. Esta depende de vários fatores clínicos como idade, sexo, localização e tipo de tratamento realizado.

A etiologia dos tumores ainda é desconhecida. Existem dúvidas inclusive se estes tumores constituem neoplasias verdadeiras ou se são apenas proliferações fibroblásticas que têm início devido à estímulos (fatores de crescimento, mutações, outros) também desconhecidos até o momento.

Material e métodos

Fragmentos de tumor desmóide e de pele normal foram obtidos de pacientes que foram operados pelo grupo de Cirurgia Oncológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os fragmentos de pele normal foram obtidos do mesmo paciente portador do tumor para a realização de cultura de fibroblastos como controle normal.

Assim que a peça cirúrgica era retirada, um fragmento de aproximadamente 1cm³ era colhido da porção central do tumor. O fragmento de pele retirado tinha dimensão aproximada de 15x5x5mm. Tanto o fragmento tumoral quanto o de pele normal eram colocados em uma solução contendo 60ml de meio de cultura RPMI 1640 à 20% de soro fetal bovino filtrado, em frascos separados e levados imediatamente ao Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todo o processamento do material descrito à seguir foi realizado no fluxo laminar e sob condições rigorosas de esterilidade. Os fragmentos de tumor desmóide e de pele normal foram processados sempre separadamente desde a coleta. Os fragmentos de tecidos (tumor e pele) foram lavados três vezes em três placas de Petri estéreis e descartáveis com 10ml de meio de cultura RPMI 1640 e cortados em pequenos fragmentos de 1mm com tesoura de iris curva e pinça anatômica delicada estéreis. Os fragmentos tumorais foram transferidos para um tubo de ensaio estéril de 20ml, submersos em 10ml de meio RPMI 1640 à 20% de soro fetal bovino filtrado e centrifugados a 2 mil rotações por minuto durante dez minutos. Após isto o meio de cultura era aspirado e os fragmentos eram transferidos para frascos plásticos de cultura de 25cm² de área sendo colocados de quatro a cinco fragmentos de tumor em cada frasco de 2,5ml de meio de cultura RPMI 1640 à 20% de soro fetal bovino. Também foram colocados alguns fragmentos em lamínulas e estas mergulhadas em placas de Petri plásticas estéreis contendo 5ml de meio de cultura RPMI 1640 à 20% de soro fetal bovino filtrado. Tanto os frascos de cultura quanto as placas de Petri contendo as lamínulas foram levadas à estufa mantendo-se a temperatura em 37 graus Celsius, o nível de CO₂ em 5% e a umidade à 100%.

Os frascos de cultura eram examinados diariamente para

a detecção de contaminação precoce e observação do crescimento celular (7). O meio era trocado a cada 48 horas sendo repostado por volume e concentrações idênticas do meio já citado. As células derivadas dos explantes tumorais geralmente apareciam após 72 horas de cultura, sendo que o crescimento celular ocupava 90% da extensão do frasco após duas a três semanas de cultura, quando então era realizada a primeira passagem (primeira subcultura). Para a realização da tripsinização todo o meio de cultura era aspirado. A seguir as células eram lavadas com 5ml uma solução salina de fosfato + EDTA (FBS-EDTA) que era aspirada e desprezada logo após. As células tratadas com 2ml de tripsina à 0,05% por dois a três minutos. Após este período, os frascos eram examinados ao microscópio para observarmos o desprendimento total das células da superfície de crescimento. Era adicionado 2ml de soro fetal bovino à 20% para inativação da tripsina. As células obtidas foram passadas para dois outros frascos de cultura de 25cm² contendo 5ml de meio de cultura RPMI à 20% de soro fetal bovino filtrado e recolocadas imediatamente na estufa sob às mesmas condições já citadas.

Os explantes de pele foram colocados sem a epiderme diretamente nos frascos de cultura de 25cm² contendo 2,5ml de meio de cultura RPMI 1640 à 10% de soro geral bovino filtrado e levados à estufa de CO₂ sob as mesmas condições que os explantes tumorais. Alguns explantes foram colocados para crescer em lamínulas de maneira idêntica aos tumores. Procedimentos iguais de observação e trocas de meio de cultura foram realizados também para as culturas de pele.

Preparo das lamínulas para a análise histológica

Lamínulas contendo células de cultura primária e de terceira subcultura de pele normal e de tumor desmóide foram coradas pela hematoxilina-eosina e examinadas à microscopia ótica convencional no décimo quinto dia de subcultura de tumor e de pele.

Resultados

As culturas de pele normal apresentaram crescimento mais rápido que as de tumor desmóide, pois após 15 dias de cultura primária mais de 90% do frasco de cultura já estava preenchido com fibroblastos sendo então realizada a primeira subcultura. Por outro lado, a cultura de tumor desmóide cresceu mais lentamente e a primeira subcultura só foi possível após quatro semanas de crescimento.

Após três meses foi possível obter a oitava subcultura de pele normal e a terceira subcultura do tumor desmóide. Após

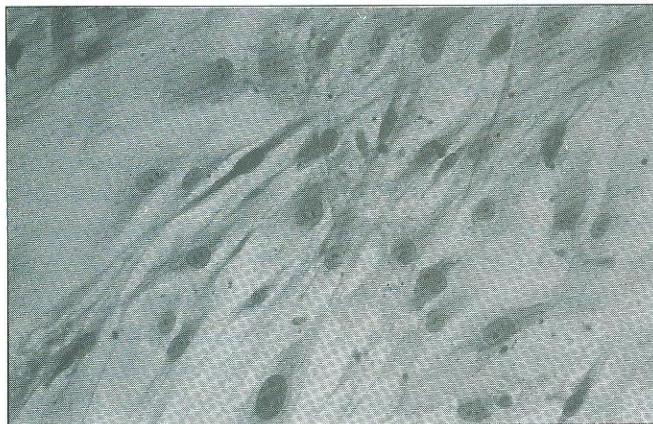


Figura 1 - Células de tumor desmóide em cultura aos 15 dias de terceira subcultura (aumento de 100 vezes).

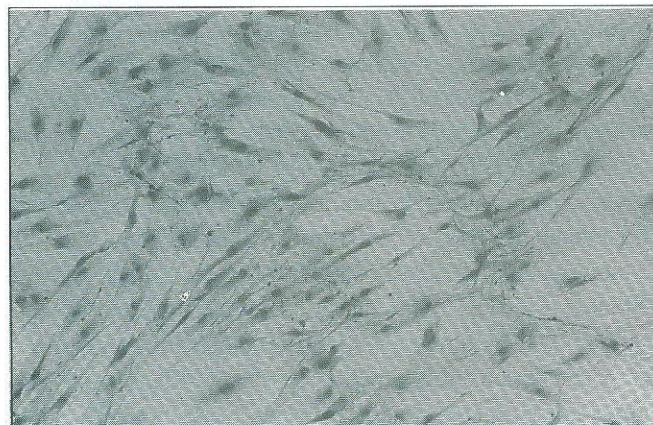


Figura 2 - Mesmas células da figura 1: aumento de 400 vezes.

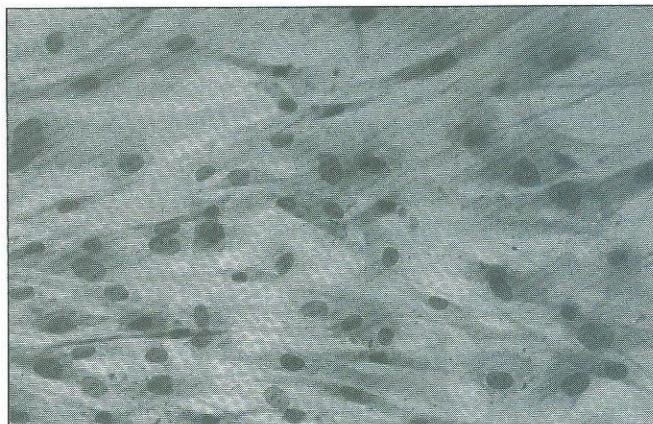


Figura 3 - Fibroblastos de derme normal proveniente do mesmo paciente portador do tumor desmóide: células aos 15 dias de terceira subcultura (aumento de 100 vezes).

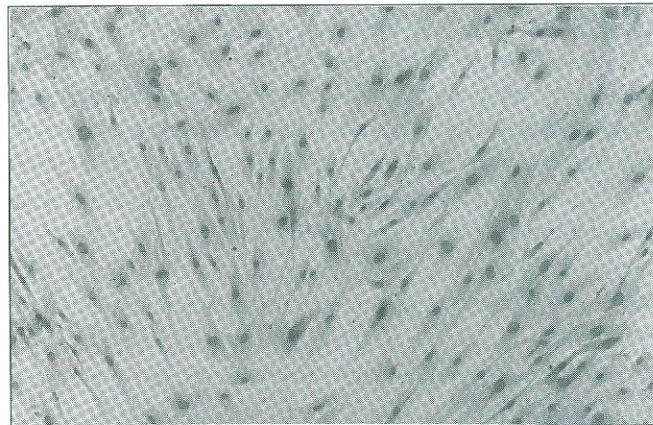


Figura 4 - Mesmas células da figura 3: aumento de 400 vezes.

este período as células não mais progrediram em cultura, tanto as de pele normal quanto as do tumor desmóide.

Algumas características histológicas foram observadas na microscopia ótica comum com a coloração das células de cultura pela técnica convencional da hematoxilina-eosina.

As células do tumor desmóide (fibroblastos tumorais) apesar de crescerem mais lentamente que os fibroblastos normais da pele, apresentaram à microscopia ótica algumas alterações, tais como, empilhamento das células não respeitando o espaço que deve normalmente existir entre uma membrana celular e outra e desorganização na sua distribuição geral (figuras 1 e 2).

Já os fibroblastos normais apresentaram um crescimento em monocamada, com arranjo regular, orientado entre as células e ausência de empilhamento entre uma célula e outra (figuras 3 e 4).

Discussão

Como sabemos, as alterações do fenótipo celular aparecem após alterações genéticas. De fato, *Karlsson et al.*, 1988

(3) e *Bridge et al.* 1992 (1), demonstraram através de estudo citogenético de tumores desmóides a existência de anormalidades cariotípicas. Os rearranjos cromossômicos encontrados foram variados, complexos e não constantes e observados em pelo menos metade do número de metáfases observadas. *Karlsson* estudou apenas um caso, porém *Bridge* apresenta um estudo citogenético de 26 casos de tumores desmóides, sendo três dos casos portadores de síndrome de Gardner.

Até o momento, estes tumores têm sido considerados, por alguns, como proliferações fibroblásticas e não como verdadeiras neoplasias. Por outro lado, alguns patologistas o consideram como fibrossarcomas de baixo grau. Na nossa opinião consideramos estes dois tumores como entidades distintas entre si, uma vez que existem diferenças histológicas à microscopia ótica que conseguem individualizar os dois tipos de doenças. Os tumores desmóides apresentam células alongadas, fusiformes, de aspecto uniforme, infiltrando a musculatura estriada através de infiltrações perimisiais (2). Estas células são separadas umas das outras por abundante quantidade de colágenos dos tipos I e III (7). Não há atípias

celulares e nem núcleos hiper cromáticos. Não dão metástases à distância.

Já o fibrossarcoma de baixo grau apresenta uma celularidade bem maior com menor quantidade de colágeno e maior vascularização. São vistas várias figuras de mitoses atípicas e núcleos hiper cromáticos. Podem dar metástases à distância.

Conclusões

As células de cultura dos desmóides apresentaram algumas características de células neoplásicas malignas em cultura, tais como empilhamento celular e desorganização na sua distribuição geral, quando comparadas com fibroblastos normais da pele do mesmo paciente em cultura. Estas alterações são provavelmente o reflexo de altera-

ções cromossômicas existentes já descritas.

Sabemos também que clinicamente estes tumores apresentam um comportamento local agressivo, podendo invadir estruturas vaso-nervosas e até periosteio, apesar de não darem metástases hematogênicas.

Todas estas observações nos induzem a acreditar que os tumores desmóides sejam realmente verdadeiras neoplasias. Portanto, achamos que estudos moleculares deveriam ser realizados para que esta doença, que há tantos anos vem intrigando os cirurgiões, seja esclarecida.

Apesar da não comprovação tumoral da patologia, ela deve ser tratada como uma neoplasia localmente agressiva. Para isto a ressecção cirúrgica ampla com margens livres, eventualmente a complementação com radioterapia externa e até mesmo braquiterapia nos casos recidivados, devam ser realizadas.

Summary

The first publication of desmoid tumors was in 1832 and up to now the etiology is still unknown. Some pathologists believe that they are only benign fibroblastic proliferations and some that they are true neoplasms.

We have established a primary cell culture of these tumors and we have made a histologic comparison with a cell culture of normal skin of the same patient. We verified that there were significant histologic differences between the fibroblasts of the desmoid tumor and those of the normal skin. These differences may suggest a tumoral behaviour of the desmoid cells in culture.

Referências bibliográficas

- BRIDGE, J. A.; SREEKANTIAH, C.; MOURON, B.; NEFF, J. R.; SANDBERG, A. A.; WOLMAN, S. R. - Clonal chromosomal abnormalities in desmoid tumors: implications for histopathogenesis. *Cancer*, 69:430-36, 1992.
- ENZINGER, F. M.; WEISS, S. W. - *Soft tissue tumors* 2ª ed. St. Louis, C. V. Mosby, 1988.
- KARLSSON, I.; MANDAHL, N.; HEIM, S.; RYDHOLM, A.; WILÉN, H.; MITELMAN, F. - Complex chromosome rearrangements in an extraabdominal desmoid tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 34: 241-45, 1988.
- MAC FARLANE, J. - Clinical reports on the surgical practice of the Glasgow Royal Infirmary. Glasgow: D. Robertson, p. 63-66, 1832 apud Reitano, J. J., 1986, p. 230.
- MÜLLER, J. - Ueber den feiner Bau und die Formen der Krankhaften Geshülste. Berlin: G. Reiner and Erste Lieferung, 1838: 60 apud Reitano, J.J., 1986, p. 230.
- REITAMO, J. J.; SCHUNIN, T. M.; HAJRY, P. - The desmoid syndrome: new aspects in the cause, pathogenesis and treatment of the desmoid tumor. *Am. J. Surg.* 151:230-7, 1986.
- SETHI, J.; HIRSHAUT, Y.; HAJDU, S.; CLEMENTS, L. G. - Growing sarcomas in culture. *Cancer*, 40:744-55, 1977.
- SMIRNOV, A. V.; Blinov, V. M.; SHAKHONINIM, S. P.; DOMOGATSKY, G.L.; IDELSON, G.L.; RUKOUEV, V.S. - Collagen in desmoids. *Arkhiv Patol.*, 46(10):42-7, 1984.